

(Aus dem Hygiene-Institut der Universität Basel
Direktor: Prof. Dr J. Tomcsik)

**Verwendung von Adjuvantien
zur Gewinnung von Antikörpern gegen
das Kapselpolypeptid des
Bacillus anthracis**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde an der Medizinischen
Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Martin Eisner

von Basel

1958



19

59

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. *J. Tomcsik*.

Tag der Promotion: 4. Juli 1958.

Sonderdruck aus «Schweiz. Zeitschrift für Allgemeine Pathologie und
Bakteriologie», Vol. 22, Nr. 2, 1959.

Die Gewinnung eines spezifischen Antikörpers gegen die Substanzen der Kapsel des *Bacillus anthracis* auf dem Wege der künstlichen Immunisierung bietet große Schwierigkeiten. *Tomcsik* und *Ivanovics* (35) erhielten eine gute Antikörperproduktion, zwar nach Verlust von einem Viertel der Tiere, aber doch noch bei 63% der Überlebenden. Später hatte *Ivanovics* (24) ungünstigere Resultate und schloß daraus auf eine geringe Antigenwirkung der Kapselsubstanz. Über Schwierigkeiten äußern sich auch *Gladstone* (11) und *Hanby* und *Rydon* (16), welche ebenfalls auf die geringe Antigenwirkung der bekapselten Bakterien hinwiesen. Auch *Tomcsik* hatte später nicht mehr die gleich guten Resultate erhalten. Es waren jeweils mindestens 15 intravenöse Injektionen nötig, um überhaupt Antikörper gegen die Kapsel zu erhalten (persönliche Mitteilung).

Der Gehalt eines vollwertigen Kaninchenserums an Antikörpern ist so groß, daß das Serum noch mit einer Antigenverdünnung von 1 : 10 Millionen spezifisch präzipitiert wird.

Die Kapselsubstanz des *B. anthracis* besteht aus D(-) Glutaminsäure-Polypeptid (16, 25, 33, 34). Es ist ein Hapten, wird aber in Bindung an andere Substanzen der Bakterienoberfläche zum Vollantigen. Kapseln werden von virulenten Milzbrandbazillen bekanntlich unter gewöhnlichen Bedingungen und auf gewöhnlichem Agarnährboden trotz ausgiebigem Wachstum der Bakterien nicht gebildet. Hingegen gelang es *Preis* (27) Milzbrandbazillen bei Züchtung in reinem, inaktiviertem Pferdeserum zur Kapselbil-

* Für diese Arbeit wurde ein Beitrag aus Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes zur Verfügung gestellt.

Eingegangen: 3. 5. 1958.



dung anzuregen. *Nungesser* (26) und später *Ivanovics* sowie *Sterne* konnten überdies auf gewöhnlichem Nährboden kapselhaltige Kulturen erhalten, indem sie die Bakterien in einer Atmosphäre von 10—25 Vol% CO₂ züchteten. *Hanby* und *Rydon* (16) sowie *Thorne* und Mitarbeiter (32) erhielten ebenfalls kapselhaltige Bakterien in *Gladstone-Fildes*-Nährboden in einer 10%igen CO₂-Atmosphäre.

Mit schwachen Antigenen können genügende Antikörpermengen gebildet werden, wenn den Antigenen vor der Injektion Adjuvantien beigegeben werden (29). Geeignet sind einfache Substanzen wie Tapioca, Alaun, Al(OH)₃, AlPO₄ und komplexere Gemische wie Emulsionen von Wasser in Öl mit Zugabe von Tuberkelbazillen (7, 29). Die mit den einzelnen Adjuvantien erreichten Resultate wechseln quantitativ je nach den verwendeten Antigenen. Mit bakteriellen Antigenen wurden folgende Adjuvantien verwendet: Alaun bei *B. anthracis* nach *Ramon et al.* (30), Al(OH)₃ bei *Salmonella typhi* nach *Mann* und *Spinka* (25), «Wasser in Öl»-Emulsion bei *Shigella paradysenteriae* nach *Halpert et al.* (15), «Wasser in Öl»-Emulsion mit Zugabe von Tuberkelbazillen bei *Salmonella typhi* nach *Freund* (3, 4, 5, 6). Dieser Forscher hat diese Methode eingeführt und genau im einzelnen studiert (7). Alaun und Aluminiumhydroxyd werden als Adjuvantien bei den Toxoiden allgemein gebraucht. Für andere Antigene und besonders für tierexperimentelle Untersuchungen wird mehr und mehr die Emulsionsmethode angewendet. Die Darstellung der «Wasser in Öl»-Emulsion gelingt durch die neuen Netzmittel der Sorbitanreihe (z. B. Arlacel und Span) leicht, und damit ist eine der wesentlichen Schwierigkeiten der Methode beseitigt. *Freund* (3, 4) stellte sich die Frage, ob die einzelnen Komponenten des ursprünglichen Adjuvans, nämlich Paraffinöl, Tuberkelbazillen und Emulgator wesentlich seien und welche mengenmäßige Zusammensetzung die beste sei. Wird Paraffinöl durch pflanzliche Öle ersetzt, so ist die Adjuvanswirkung der Emulsion kaum mehr vorhanden. Hingegen können andere Mykobakterien und Mikroorganismen verwendet werden, sofern sie die Wachsfraktion von *Mycobacterium tuberculosis* enthalten, z. B. *Nocardia asteroides*. Bei dieser Wachsfraktion handelt es sich um Ester höherer Fettsäuren mit höheren Alkoholen und Polysacchariden (28). Als Netzmittel hat sich Arlacel gegenüber Falba, Cholesterin und Lecithin als gleichwertig und einfacher im Gebrauch durchgesetzt. «Wasser in Öl»-Emulsion

hat keine Adjuvanswirkung. Die Wirkung der Tuberkelbazillen wird verschieden beurteilt.

Während Freund in seinen Versuchen mit *Salmonella typhi* und Gewebeprei eine deutliche Verbesserung der Adjuvanswirkung fand und auch nie eine Toxizität des reinen Adjuvans feststellen konnte (3, 5, 9) und andere mit ihm einig gehen (1), sahen Halpert und Mitarbeiter bei Verwendung von *Shigella paradysenteriae* (15) keinen merklichen Unterschied gegenüber Emulsionen ohne *Mycobacterium tuberculosis*. Auf die Toxizität des reinen Adjuvans wird von Friedewald (10) und Weiß und Dubos (37) bereits hingewiesen, Rothbard und Watson (31) und Voisin und Delaunay (36) belegen sie mit ausgedehnten Versuchen. Die histologischen Veränderungen, welche die Folge dieser Toxizität sein sollen, zeigen sich in den Nieren als Amyloidose und vor allem in den Testikeln als Aspermiogenese. Sie sollen nur entstehen, wenn der Emulsion Tuberkelbazillen oder gleichartige Mikroorganismen beigegeben worden sind. Freund (8) konnte diese Mitteilungen bei einer genauen Nachkontrolle nicht bestätigen.

Vergleichende Untersuchungen über die Resultate mit dem Freund'schen Adjuvans und Aluminiumhydroxyd (18) und mit Alaun (13) zeigen die Überlegenheit des Freund'schen Adjuvans, während der Vergleich mit mehrmaliger intravenöser Injektion des Antigens in physiologischer Kochsalzlösung nach der klassischen Methode ergibt, daß bei dieser die Antikörpertiter doch höher zu sein pflegen. Dagegen wird von allen Forschern ein Vorteil der Adjuvansanwendung im allgemeinen, besonders aber jener der Emulsion darin erblickt, daß das Serum über lange Zeit, d. h. zum Teil über mehr als zwei Jahre einen hohen Antikörpertiter aufweist. Ungleiche Resultate müssen offenbar so ausgelegt werden, daß die stimulierende Wirkung des Adjuvans nicht für alle Antigene gleich stark ist.

Die vorliegende Arbeit berichtet über Versuche, in welchen Adjuvantien zur Verbesserung der Antikörperproduktion gegen die Kapselsubstanz von Milzbrandbazillen verwendet wurden.

Material und Methoden.

A. Bacillus anthracis-Stämme.

1. Vollum NCTC Nr. 7200.
2. Stamm A 3 des Hygiene-Instituts Basel.

Der Stamm Vollum NCTC Nr. 7200 wurde in unverdünntem inaktiviertem Pferdeserum gezüchtet. Nach 2 Passagen in Pferdeserum mit 1% bzw. 2% Glukose (23,27) wurden 2 Tropfen der Kultur in 40 ccm Pferdeserum mit 1% Glukose überimpft. Nach 20 Stunden bei 37° C wurde 20 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert und zweimal mit phys. Kochsalzlösung gewaschen. Die Hälfte der so behandelten Bazillen hatte eine deutliche Kapsel, wie die spezifische Kapselreaktion im Phasenkontrastmikroskop zeigte. Sterilisierung 30 Min. bei 60° C genügte, da in diesen Kulturen keine Sporen vorkamen. Nach der Sterilitätsprobe wurden die Bakterien in dichter Suspension abgefüllt und lyophilisiert. Eine Ampulle enthielt 20 ± 2 mg Trockensubstanz.

Stamm A 3 wurde auf gewöhnlichem Agar in einer Atmosphäre mit 10% CO₂ während 20 Stunden bebrütet. Danach wurden die Platten mit phys. Kochsalzlösung abgespült, die Suspension wiederum 30 Min. bei 60° C sterilisiert und lyophilisiert. Da bei der Sterilitätsprobe ziemlich viele Sporen auskeimten, war eine erneute Sterilisation 20 Min. bei 100° C notwendig. Später gingen wir dazu über, vor dem Lyophilisieren die Kulturen bei 100° C zu sterilisieren. Eine Ampulle enthielt 20 ± 3 mg Trockensubstanz.

B. Kaninchen.

Eine besondere Auswahl wurde nicht getroffen. Wir immunisierten Tiere mit einem Gewicht zwischen 2500 und 3500 g.

C. Vaccinen.

1. Die Suspension der Bakterien wurde in dest. Wasser zur intravenösen Injektion in der Weise hergestellt, daß 1 ccm für die ersten 4 Injektionen ca. 5 mg, für die zweiten 4 Injektionen ca. 10 mg, und für die nachfolgenden Injektionen ca. 20 mg Trockensubstanz enthielt. Die Injektionen gaben wir zuerst jeden 2. Tag und vergrößerten allmählich das Intervall bis auf 5 Tage.

2. Mit Alaun ($K Al(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$) wurde eine frische 10%-Lösung hergestellt und im Autoklaven bei 120° C 15 Min. sterilisiert. Zirka 20 mg Anthraxbazillen wurden in 4 ccm destilliertem Wasser suspendiert und 1 ccm Alaunlösung zugegeben (Endkonzentration des Alauns 2%). Nach der Sedimentation des Präzipitates, d. h. nach ca. einer Stunde, wurde 10 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und das Präzipitat in ca. 2 ccm phys. Kochsalzlösung zur Injektion suspendiert (30). Ein Kaninchen erhielt eine, ein anderes 4 subkutane Injektionen in Abstand von je einer Woche.

3. Das Aluminiumhydroxyd-Gel wurde nach Hawk et al. (17) nach der folgenden Vorschrift hergestellt: 11 g $(NH_4)_2SO_4$ in 300 ml H₂O von 63° C und 50 ccm 10% NH₃ von 58° C wurden unter Rühren zu 38,5 g $(NH_4)Al(SO_4)_2$ in 75 ml H₂O von 58° C zugegeben. Nach 30 Min. wurde zentrifugiert. Das Gel wurde danach in 750 ccm Wasser mit 1,25 ccm konz. Ammoniak suspendiert und zweimal mit dest. Wasser gewaschen. Das so erhaltene Gel wurde im Autoklaven sterilisiert und nach erneutem Zentrifugieren das überstehende Wasser abgegossen. Ca. 20 mg lyophilisierte Bakterien wurden nach ihrer Suspension mit 1 ccm $Al(OH)_3$ zusammengebracht, einige Zeit stehen gelassen und zentrifugiert. In der überstehenden Flüssigkeit soll kein Antigen mehr

nachweisbar sein. Der flockige Niederschlag wurde darauf zur Injektion suspendiert. Ein Kaninchen erhielt eine, ein anderes vier subkutane Injektionen im Abstand von je einer Woche.

4. Zur Herstellung der «Wasser in Öl»-Emulsion wurden ca. 20 mg Bakterien in ca. 4 ccm destilliertem Wasser suspendiert, dann zentrifugiert und soviel Wasser abgesogen, daß nur noch höchstens 1 ccm Suspension zurückblieb. Paraffinöl — wir verwendeten Paraffinum perliquidum Ph.H.V. (0,25 bis 0,3 Poisen) — wurde im Autoklaven sterilisiert. Die Sterilisation des Netzmittels erfolgte ebenfalls im Autoklaven bei 120° C 15 Min. Zuerst verwendeten wir Arlcel A, später aus praktischen Gründen Span 80.

Zu Beginn der Arbeit stellten wir die Emulsion in einer 10 ccm-Rekordspritze her. Zuerst wurden pro dosi 2 ccm Paraffinöl bei ca. 40° C mit 0,3 ccm Arlcel A, bzw. 0,5 ccm Span 80 gemischt und in die Spritze durch eine grobe Nadel aufgesogen. Dieses ölige Gemisch wurde unter Druck in das Röhrchen eingespritzt, welches die Bazillensuspension enthielt. Zur Erzielung einer gleichmäßigen und stabilen Emulsion war es nötig, die Mischung 30- bis 40mal aufzuziehen und wieder auszuspritzen. Das war bei erhöhter Temperatur von ca. 40° C leicht.

Später wurde die Emulsion im Reagensglas mit Hilfe eines einfachen elektrischen Motors hergestellt. An der zentralen Achse des Motors befand sich — leicht abnehmbar für die Sterilisation — ein Metallröhrchen von ca. 15 cm Länge und 5 mm Außendurchmesser mit 2 Bohrlöchern am freien Ende. Auf einem Stativ wurde der Motor in der Weise montiert, daß das Metallröhrchen in das Reagensglas, das am gleichen Stativ befestigt war und die zur Emulsion notwendigen Substanzen bereits enthielt, von oben eintauchte ohne den Reagensglasboden zu berühren. Der Motor wurde bei ca. 5000 U/Min. drei Min. laufen gelassen, womit sicher eine stabile Emulsion erzielt wurde. Bei dieser Methode konnte die Menge von Span 80 auf 0,2 ccm vermindert werden. Sollte die Emulsion Tuberkelbazillen enthalten, so wurden diese bei 100° C in 5 Min. sicher abgetötet und vor jeder andern Beigabe im Paraffinöl suspendiert.

Die Kaninchen erhielten die Hälfte der Dosis von zirka 3 ccm tief subkutan unterhalb des Schulterblattes je links und rechts eingespritzt. Wir gaben eine, zwei oder drei derartige Doppelinjektionen in Abständen von 3 oder 7 Tagen.

D. Blutentnahme und Antikörperbestimmung.

1. Von der dritten Woche nach der ersten Injektion gerechnet wurden wöchentlich aus der Ohrvene einige ccm Blut entnommen. Mit dem Serum stellten wir eine Ringpräzipitationsprobe in geometrischer Verdünnungsreihe an mit dem D(—)Glutaminsäure-Polypeptid, das mir von Herrn Prof. *Tomcsik* freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

2. Einige der Kaninchen wurden entblutet, als der Antikörper-

titer im Serum am höchsten war, und das Serum durch Zugabe von Merthiolat konserviert. Bei diesen Seren nahmen wir die quantitative Antikörperbestimmung nach *Heidelberger* und *Kendall* vor (19, 20, 21). Es wurde in folgender Weise vorgegangen:

Von jedem Serum wurden 2 Proben von 0,5 ccm mit einem leichten Antigen-Überschuß gut gemischt. Dieser Antigenüberschuß bestand für Sera, die das Milzbrandpolypeptid noch in über 1 : 2 Millionen Verdünnung präzipitierten, in 0,1 mg Antigen pro ccm Serum. Es mußten daher die Proben von 0,5 ccm Serum mit 0,5 ccm Polypeptidlösung, welche 1 : 10 000 verdünnt war, gemischt werden. Weiterhin wurde je ein Blindversuch von 0,5 ccm Serum und 0,5 ccm Wasser angesetzt. Nach 30 Min. bei 37° C wurden die Reagensgläser für eine Woche in den Eisschrank gestellt. Das Entfernen des nicht spezifisch präzipitierten Proteins erfolgte durch mehrmaliges Auswaschen in der Kälte. Bis zur Zugabe der Natronlauge (s. u.) soll am besten im Kühlraum gearbeitet werden. Die Gemische wurden 15—20 Min. bei 1500 U/Min. zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit sorgsam abgegossen, die Gläser einige Minuten mit der Öffnung nach unten stehen gelassen und der letzte Flüssigkeitstropfen am Rande mit Filtrierpapier abgewischt. Das Präzipitat schüttelten wir mit 0,5 ccm eiskaltem dest. Wasser auf, gaben weitere 2 ccm zu und ließen eine halbe Stunde stehen. Dieser Arbeitsgang wurde 2mal wiederholt, anschließend nochmals zentrifugiert und das Präzipitat wie oben getrocknet.

Mit wenig Wasser wurde das Präzipitat von der Wand des Glases gelöst, 0,2—0,3 ccm n/10 NaOH zugefügt und die vollständige Auflösung des Präzipitates abgewartet. Dann wurde mit Wasser auf 2,5 ccm aufgefüllt und gut gemischt. 2 ccm davon wurden 6 ccm 12,5% Na_2CO_3 und 1 ccm 0,1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ zugegeben. Nach einer Stunde bei Zimmertemperatur wurde von frisch verdünntem Folin-Ciocalteu-Reagens (2) (1 Teil Reagens zu 2 Teilen Wasser) 1 ccm zugegeben. Nach 20 bis 30 Min. wurden die Farbwerte im Colorimeter abgelesen, indem die Blindversuche als Nullwert eingestellt wurden.

Mit Hilfe einiger Proben, deren Stickstoffgehalt im Mikrokjeldahlverfahren ermittelt wurde, berechneten wir den Umrechnungsfaktor von Colorimeter-einheit auf Stickstoffgehalt.

Resultate.

1. Das mit 13 intravenösen Injektionen von Milzbrandbazillen in phys. Kochsalzlösung behandelte Kontrollkaninchen zeigte nach der 5. Woche einen Präzipitintiter von 1 : 10^4 , welcher in der 7. Woche nach weiteren 3 Injektionen auf über 1 : 10^6 stieg. Die quantitative Bestimmung ergab 0,16 mg Antikörper pro ccm Serum.

Eine in einem älteren Serum des Instituts vorgenommene Kontrolle ergab 0,20 mg/ccm (A 5b, 15 i.v. Injektionen, 1953).

2. Im Serum der Kaninchen, welche an Alaun adsorbierte Bazillen injiziert erhalten hatten, ließen sich bis 12 Wochen nach

Beginn der Immunisierung weder bei einer noch bei vier Injektionen Antikörper gegen das Polypeptid nachweisen (3 Tiere).

3. Auch bei den Tieren, welchen wir an Aluminiumhydroxyd adsorbierte Keime injiziert hatten, fanden wir weder nach einer noch nach 4 Injektionen Antikörper im Serum. Jedoch bildete sich bei einem der drei Tiere an der Injektionsstelle ein kleines Knötchen, welches nach 10 Wochen wieder verschwand.

4. Die Injektion von nicht voll abgetöteten, schwach virulenten Keimen (zufällige Beobachtung) führte, auch in Adjuvantien verabreicht, nach drei Tagen zum Tode an Milzbrandsepsis (4 Tiere).

5. Behandlung mit Emulsionen (siehe Tabelle I).

Bei einer — auf 2 Stellen im Körper verteilten — Injektion konnte die erste spezifische Reaktion nach 6 Wochen festgestellt werden. Nach 8 Wochen erreichte der Präzipitintiter $1 : 10^6$. Nach 10 Wochen fiel er wieder ab und blieb bis zur 18. Woche um $1 : 10^5$.

Bei 2 Injektionen stieg der Titer bereits nach 4—5 Wochen stark an und erreichte in der 5.—6. Woche den Wert von $1 : 8 \cdot 10^6$ oder $1 : 10^7$. Diese maximale Titerhöhe stellten wir noch in den darauffolgenden drei Wochen fest. Danach begann der Titer in ein bis zwei Wochen auf $1 : 10^5$ oder $1 : 2 \cdot 10^5$ zu fallen. Auf dieser Höhe hielt er sich dann während der Beobachtungszeit von 6 Monaten.

Bei drei Injektionen waren die Werte gleich wie bei zwei Injektionen; auch waren die Resultate identisch, wenn wir im Öl keine Tuberkelbazillen suspendiert hatten. Durch Vermehrung der Bakterienmenge pro Injektion versuchten wir eine weitere Erhöhung der Titer zu erreichen. Dies gelang nicht. Dazu muß gesagt werden, daß es technisch schwierig war, mit mehr als 20 mg Bakterien in 2 ccm Öl eine einwandfreie Emulsion herzustellen. Eine größere Menge Öl wollten wir nicht verwenden, da eine allzustarke lokale Reaktion zu befürchten war (14).

Die individuellen Reaktionsunterschiede zwischen den einzelnen geprüften Kaninchen waren im Verhältnis zu den Bestimmungsmethoden gering. Zeitlich trat die erste meßbare Reaktion mit einem Unterschied von höchstens einer Woche auf. Der maximale Antikörpergehalt wurde in noch geringerem Maße zeitlich verschieden gefunden.

Bei allen Tieren ließ sich nach 2 Wochen und während der

ganzen Beobachtungsdauer an den Injektionsstellen ein Granulom palpieren. Die Größe des Granuloms erreichte nach 3 Wochen ihr Maximum, schwankte dann bei jedem Tier, indem es z. B. nach einer mehrwöchigen Verkleinerung plötzlich wieder anschwell. Mit der Titerhöhe ging die Granulombildung nicht parallel. Bei einigen nach 4 Monaten vorgenommenen Sektionen zeigten die Knötchen die Größe einer Mandel. Im Zentrum fand sich meist noch spurenweise bröckeliger Brei. Die Dicke der Wand betrug 4—5 mm. In der Umgebung fanden sich streifige Verwachsungen. Histologische Untersuchung zeigte kleinere und größere Cysten, in deren Wand reichlich eosinophile Leukozyten, Pseudoxanthomzellen und Fremdkörperriesenzellen eingelagert waren.

Die Dauer der Antikörperbildung (Tabelle I und graphische Darstellungen) verfolgten wir nur über sechs Monate. Dabei stellten wir fest, daß nach dem Absinken in der 9. Woche der Titer meistens auf $1 : 10^5$ stehenblieb. Bei einigen Tieren versuchten wir, durch weitere Injektionen von Emulsion nach einigen Monaten den Titer wieder zu erhöhen. Das gelang selten und auch dann nur bis auf $1 : 10^6$ oder $1 : 2 \cdot 10^6$ (A 11 und A 19).

TABELLE I.

Titerverlauf bei verschiedenen Variationen der Vorbehandlung der Kaninchen.

Tier	Zahl Inj.	Tbc*	Wochen nach Immunisierungsbeginn								
			3	4	5	6	7	8	9	14	20
A 8	1	+	—	—	—	0,01	1	2	1	0,1	0,1
A 12	2	—	—	—	2	4	8	8	2	0,1	0,1
A 17	2	—	—	0,1	1	10	10	10	5 **		
A 16	3	—	—	1	10	10	10	10	5 **		
A 11	2	+	0,1	2	2	8	8	1	2	0,2	0,1
A 10	2	+	0,5	2	10	10	10	5	5	0,1	0,1
A 15	2	+	0,01	0,1	2	8	8	5	5 **		
A 13	2	+	0,5	2	10 **						
A 9	3	+	0,01	1	2	8	10	5	5	0,1	0,1
A 18	3	+	0,1	2	2	10	10	5	1	0,1	0,1

* Zugabe von M. tuberculosis.

** Entblutet.

Der Titer ist angeführt in $1/10^6$. Titer 0,1 bedeutet daher $1:10^5$. Titeranstieg finden wir bis zur 6. bis 8. Woche. Der Abfall beginnt 2 bis 3 Wochen später.

Die Frage, ob Anthraxbazillen aus Pferdeserumkulturen oder solche, die in einer CO_2 -Atmosphäre gewachsen waren, die besseren Resultate geben, läßt sich aus unseren Versuchen nicht ent-

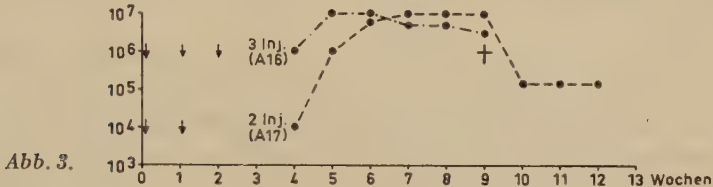
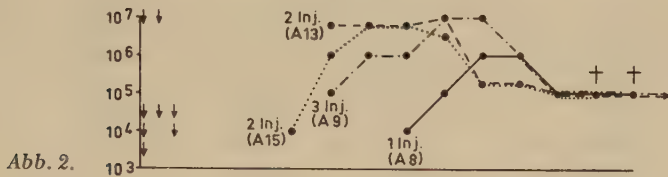
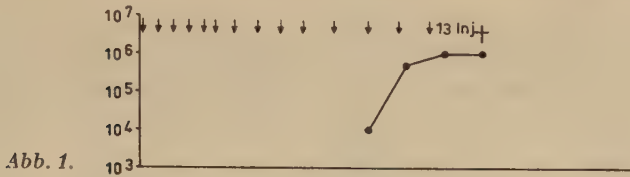


Abb. 1. Anstieg des Antikörpertiters im Serum eines intravenös immunisierten Tieres (A 14). Nach 13 i.v. Injektionen und nach 8 Wochen ist der Titer am höchsten und beträgt $1 : 10^6$.

Abb. 2. Verlauf des Antikörpertiters im Serum von 4 Tieren, die in verschiedenen Abständen subkutane Injektionen vom «Wasser in Öl»-Emulsion mit Tuberkelbazillen erhalten haben. 2 oder 3 Injektionen geben ungefähr gleiche Resultate. 1 Injektion ist schwächer wirksam. Bei † wurden die Tiere entblutet.

Abb. 3. Verlauf des Antikörpertiters im Serum von 2 Tieren, die in verschiedenen Abständen subkutane Injektionen von Emulsion *ohne* Tuberkelbazillen erhalten haben. Bei beiden Tieren finden wir fast gleiche Werte. Die Kurven sind darüberhinaus auch denen aus Abb. 2 ähnlich.

scheiden, da die Unterschiede in den Resultaten nicht über die individuelle Streuung hinausgingen.

Bei einigen Tieren kamen irrtümlich nicht voll abgetötete Bakterien zur Verwendung. Wie bei i.v. Injektion und Verwendung von andern Adjuvantien gingen die Tiere auch bei Verwendung der Emulsionsmethode ein.

Die quantitative Bestimmung des Antikörpergehaltes im Serum nach *Heidelberger* und *Kendall* ergab die in Tabelle II dargestellten Resultate.

Nach Abzug des im Blindversuch erhaltenen Wertes berechneten wir für das *Klett-Summerson* photoelektrische Colorimeter bei Ablesung mit Blaufilter einen Umrechnungsfaktor von 0,00120

TABELLE II.
Antikörpermenge in mg pro ccm Serum.

Tier	Inj.	Wochen	Titer	Colorim. Einheit	mg N/Probe	mg AK/ccm
A 5 b	15 i.v.	8	1 : 1 M	14	0,016	0,21
A 14	13 i.v.	7	1 : 1 M	11	0,013	0,16
A 17	2	6	1 : 10 M	92	0,110	1,39
A 16	3	10	1 : 5 M	70	0,084	1,05
A 11	2+Tbc	11	1 : 2 M	18	0,022	0,27
A 13	2+Tbc	8	1 : 5 M	70	0,084	1,05
A 15	2+Tbc	9	1 : 5 M	65	0,078	0,98
A 9	3+Tbc	7	1 : 10 M	82	0,098	1,23

AK = Antikörper. M = Million.

mg N bzw. 0,0151 mg Antikörper entsprechend einem Skalateilstrich ¹.

Vergleichsweise sei angeführt, daß bei Immunisierung mit intravenösen Injektionen bei maximalem Titer nur ein Antikörpergehalt von 0,16 bzw. 0,21 mg pro ccm Serum erreicht wurde. Diese Werte entsprechen dem Titer von 1 : 10⁶ sieben Wochen nach Beginn der Immunisierung.

Die Seren A 9 und A 17 hatten bei der Entnahme zur quantitativen Verarbeitung einen Titer von 1 : 10⁷, diejenigen von A 13, A 15 und A 16 von 1 : 5.10⁶, dasjenige von A 11 von 1 : 2.10⁶. Gemäß der Tabelle entsprechen diese Titer einer Entnahme des Serums nach 5 bis 7, bzw. 9 bis 10, bzw. 11 Wochen. Der starke Abfall zwischen der 9. und der 11. Woche ist allgemein deutlich, wie sich ja schon mit der einfachen Ringpräzipitationsprobe ergab. Überhaupt zeigt die Zusammenstellung klar, wie gut Ringpräzipitation und Antikörperbestimmung nach *Heidelberger* übereinstimmen.

Der größte Gehalt an Antikörpern betrug 1,39 mg pro ccm Serum. Dabei gingen wir vom Stickstoffgehalt aus, der mit 6,25 multipliziert den Proteingehalt ergab. Der niedrigste Wert war fast 9mal kleiner mit 0,16 mg pro ccm. Diese Werte entsprechen einem Anteil Antikörperprotein im Serum von 139, bzw. 16 mg%. Bei einem Gehalt von 6% Serumeiweiß beim Kaninchen bedeutet das, daß der Anteil dieses speziellen Globulins am Gesamteiweiß 1,99, bzw. 0,23% beträgt.

Die inaktivierten Seren ergaben in unserem Falle sozusagen

¹ Herrn Dr. Müller, Kantonschemiker in Basel, sei für die Probebestimmung im Kjeldahl-Verfahren bestens gedankt.

gleiche Resultate wie die nativen Seren (s. Tabelle III). Daher durften wir darauf verzichten, eine Entfernung des Komplements anzustreben. Auch hat die Erhitzung des Serums auf 56° C offenbar keine nennenswerte Zerstörung des Antikörpers zur Folge.

TABELLE III.

Vergleich des Antikörpergehaltes in nativem und inaktiviertem Serum.

Tier	Aktives Serum		Inaktiviertes Serum	
	Colorim.	mg AK/ccm	Colorim.	mg AK/ccm
A 5 b	14	0,21	13	0,20
A 14	11	0,16	11	0,16
A 15	65	0,98	66	1,00
A 16	70	1,05	63	0,95
A 17	92	1,39	91	1,37

In unseren Anordnungen zeigte sich, daß auch die besten Seren mit einer Antigenverdünnung von 1 : 10⁴ in gleicher Menge mit ganz geringem Antigenüberschuß reagieren. Das besagt, daß 0,1 mg Polypeptid als Antigen in der Lage ist, mehr als 1,4 mg Antikörper zu binden.

Diskussion.

Wie in den früheren Arbeiten von *Tomcsik* gelang es auch diesmal, durch 13 i.v. Injektionen von abgetöteten Anthraxbazillen, die in Pferdeserum oder auf gewöhnlichem Agar unter erhöhtem CO₂-Druck zur Kapselbildung gebracht worden waren, Antikörper gegen die Kapselsubstanz zu gewinnen.

Einfacher erhielten wir diese Antikörper durch Injektion der Kulturen nach Emulsion in Paraffinöl nach der von *Freund* ausgearbeiteten Methode. Alle anderen Adjuvantien, d. h. Alaun und Aluminiumhydroxyd erwiesen sich als unwirksam. Soweit stimmen unsere Resultate mit denjenigen überein, welche mit andern Antigenen bei der gleichen Methode von andern Forschern gefunden worden sind. Während unserer relativ kurzen Beobachtungszeit von sechs Monaten blieb ebenfalls im Gegensatz zu andern Angaben (4) der Antikörpertiter im Serum nur drei Wochen hoch und sank danach wieder erheblich, um erst auf einem ungefähr 50mal tieferen Stand sich zu stabilisieren. Wir konnten auch keine Übereinstimmung zwischen der Menge des produzierten Antikörpers und der Größe des subkutanen Granuloms feststellen. Wenn der Titer schon am Absinken war, vergrößerte sich beim Versuchstier das Granulom manchmal. Beigemischte Tuberkelbazil-

len hatten in unseren Versuchen keinen nachweisbaren Einfluß. Weder stellten wir eine bessere Antikörperbildung fest, noch fanden wir an den Tieren makroskopisch Zeichen einer krankhaften Veränderung. Die Tiere blieben während der Versuche bei gutem Befinden.

Die Zahl der Injektionen und die Menge des injizierten Antigens erwiesen sich in gewissen Grenzen als unwesentlich. Zwei Injektionen erwiesen sich jedoch einer einzigen deutlich überlegen. Dies im Gegensatz zu den Angaben *Freunds* (5). Ungefähr 40 mg Anthraxbazillen lieferten in zwei Injektionen verabreicht die besten Resultate.

In Übereinstimmung mit den Angaben *Heidelbergers* ging auch in unseren Versuchen der in Milligramm gemessene Antikörpergehalt mit dem Titer der Ringpräzipitation parallel. Unterschiede von 20% können mit der Ringpräzipitation natürlich nicht erfaßt werden (19).

Wir fanden im Serum unserer Versuchstiere Antikörpermengen zwischen 0,16 und 1,39 mg pro ccm. Größenordnungsmäßig sind diese Werte die gleichen, wie sie bei experimenteller Immunisierung auch sonst gefunden wurden. Der Vergleich der Antisera, die mit und ohne Adjuvans gewonnen worden sind, zeigt, daß in unseren Versuchen das Adjuvans außer der Vereinfachung der Methode noch den Vorteil hatte, die Mengen der Antikörper zu erhöhen. Dabei muß offen bleiben, ob nicht doch durch weitere intravenöse Injektionen mit der Zeit noch größere Antikörpermengen erhalten werden könnten. Das würde dann den Angaben *Freunds* (3) entsprechen.

Zusammenfassung.

Mit bekapselten Milzbrandbazillen immunisierte Kaninchen produzieren nach mehr als 13 i.v. Injektionen Kapselantikörper. Bei Verwendung von Alaun oder Aluminiumhydroxyd als Adjuvans produzieren die Tiere nach zweimaliger s.c. Injektion keinen Kapselantikörper. Durch Emulsion der Bazillen in Paraffinöl mit oder ohne Tuberkelbazillen (*Freund'sches* Adjuvans) gelingt die Immunisierung mit 2 s.c. Injektionen. Die quantitative Antikörperbestimmung nach *Heidelberger* und *Kendall* zeigt, daß mit der Emulsionsmethode mehr als fünffach Antikörper im Serum erhalten werden, als durch i.v. Immunisierung, nämlich maximal 1,39 statt 0,21 mg pro ccm Serum. Der maximale Antikörpertiter wird

nach 6—7 Wochen erreicht. Bei Immunisierung mit «Wasser in Öl»-Emulsion erreicht er $1 : 10^7$. Er bleibt aber nur 3 Wochen hoch. Danach sinkt er in weiteren 2—3 Wochen auf zirka $1 : 10^5$.

Résumé.

Des lapins immunisés avec des bacilles du charbon encapsulés produisent des anticorps anticapsulaires après plus de 13 injections i.v. L'utilisation d'alun ou d'hydroxyde d'aluminium n'induit pas la formation d'anticorps anticapsulaires après deux injections s.c. L'émulsion des bacilles dans de l'huile de paraffine avec ou sans B. K. (adjuvant de *Freund*) fait apparaître des anticorps après deux injections s.c. Leur détermination quantitative selon *Heidelberg* et *Kendall* démontre que l'injection de l'émulsion permet d'obtenir au minimum cinq fois plus d'anticorps dans le sérum que l'immunisation i.v., c'est-à-dire au maximum 1,39 contre 0,21 mg./ml. sérum. Le titre maximum des anticorps est atteint après 6-7 semaines. Lors de l'immunisation avec une émulsion « eau dans huile », il atteint $1 : 10^7$. Cependant il ne se maintient aussi haut que durant 3 semaines. Au cours des 2-3 semaines suivantes il tombe à environ $1 : 10^5$.

Summary.

Rabbits immunized with encapsulated anthrax bacilli produce after more than 13 i.v. injections capsule antibodies. Employing alum or aluminium hydroxide as an adjuvant the animals produce no capsule antibodies after 2 repeated s.c. injections. By emulsion of the bacilli in mineral oil, with or without tubercle bacilli (*Freund's* adjuvant), the immunization succeeds with 2 s.c. injections. The antibody content was determined by the method of *Heidenger* and *Kendall*. With emulsion methods more than 5 times as many antibodies are obtained in the serum as through i.v. immunization, viz., a maximum of 1.39 mg. instead of 0.21 mg. pro ccm serum. The maximum antibody titer is attained after 6-7 weeks. By immunization with "water in oil" emulsion it reaches $1 : 10^7$. It remains high, however, only for 3 weeks and drops down to ca. $1 : 10^5$ in the following 2-3 weeks.

Literatur.

1. *Fishel, E. E.; Kabat, E. A.; Stoerk, H. C. and Bezer, A. E.*: The role of tubercle bacilli in adjuvant emulsions on antibody production to egg albumin. *J. Immunol.* 69: 611-618 (1952).

2. *Folin, O., and Ciocalteu, V.*: Tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. biol. Chem.* 73: 627-650 (1927).
3. *Freund, J. and Bonanto, M.*: The effect of paraffin oil, lanolinlike substances and killed tubercle bacilli on immunization with diphtheric toxoid and bact. typhosum. *J. Immunol.* 48: 325-334 (1944).
4. *Freund, J. and Bonanto, M.*: The duration of antibody formation after injection of killed typhoid bacilli in water-in-oil emulsions. *J. Immunol.* 52: 231-234 (1946).
5. *Freund, J.; Thompson, J.; Hough, H. B.; Sommer, H. E. and Pisani, T. N.*: Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvants. *J. Immunol.* 60: 383-398 (1948).
6. *Freund, J.*: The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization; a review. *Amer. J. clin. Path.* 21: 645-656 (1951).
7. *Freund, J.*: The mode of action of immunologic adjuvants. *Advanc. Tuberc. Res.* 7: 130-148 (1956).
8. *Freund, J.; Lipton, M. and Thompson, G.*: Aspermatogenesis in the guinea pigs induced by testicular tissue and adjuvants. *J. exp. Med.* 97: 711-725 (1953).
9. *Freund, J. and Lipton, M. M.*: Experimental allergic encephalomyelitis after the excision of the injection site of antigen-adjuvant emulsion. *J. Immunol.* 75: 454-459 (1955).
10. *Friedewald, W. F.*: Adjuvants in immunization with influenza virus vaccines. *J. exp. Med.* 80: 477-491 (1944).
11. *Gladstone, G. P.*: Immunity to anthrax: protective antigen present in cell-free culture filtrates. *Brit. J. exp. Path.* 27: 394-418 (1946).
12. *Glenny, A. T. and Barr, M.*: a) Alum-toxoid precipitates as antigens. *J. Path. Bact.* 34: 118-119 (1931); b) The precipitation of diphtheria toxoid by potash alum. *J. Path. Bact.* 34: 131-138 (1931).
13. *Halpert, S. P.; Mudd, S. and Smolens, J.*: The antigenicity of *Shigella paradysenteriae* (Flexner) in saline-in-mineral-oil emulsions. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 60: 17-19 (1945).
14. *Halpert, S. P.; Ehrlich, W. E.; Mertens, E. and Mudd, S.*: Mechanism of the augmenting action of mineral oil on antibody production. Tissue reactions and antibody response to dysentery vaccine in saline, and in saline-lanolin-mineral-oil emulsion. *J. exp. Med.* 82: 343-359 (1945).
15. *Halpert, S. P.; Mudd, S. and Smolens, J.*: The increased antigenicity of *shigella paradysenteriae* (Flexner) in saline-in-mineral-oil emulsion. Experiments in mice and rabbits. *J. Immunol.* 53: 291-301 (1946).
16. *Hanby, W. E. and Rydon, H. N.*: Capsular substance of *Bacillus anthracis*. *Biochem. J.* 40: 297-307 (1946).
17. *Hawk, H. B.; Oser, B. L. and Summerson, W. H.*: in *Practical Physiological Chemistry*, pp. 329 (The Blakiston Comp., New York 1954).
18. *Havas, H. F. and Andre, J.*: A study of the enhancing effect of adjuvants on antibody formation in mice. *Brit. J. exp. Path.* 36: 171-174 (1955).
19. *Heidelberger, M. and Kendall, F.*: Specific precipitation and mouse protection in type I antipneumococcus sera. *J. exp. Med.* 52: 477-483 (1930).
20. *Heidelberger, M.; Kendall, F. and Soo Hoo, Ch.*: Quantitative studies on

- the precipitin reaction. Antibody production in rabbits injected with an azo-protein. *J. exp. Med.* 58: 137-152 (1933).
21. *Heidelberger, M. and McPherson, C.*: Quantitative microestimation of antibodies in sera of man and other animals. *Science* 97: 405-406 (1943). Correction. *Science* 98: 63 (1943).
 22. *Ivanovics, G. und Bruckner, V.*: Chemische und immunologische Studien über den Mechanismus der Milzbrandinfektion und Immunität. I. Die chemische Struktur der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus und der serologisch identischen spezifischen Substanz des *Bacillus mesentericus*. *Z. ImmunForsch.* 90: 304-318 (1937).
Notiz zu unserer Mitteilung: Chemische und immunologische Studien über den Mechanismus der Milzbrandinfektion und Immunität. *Z. ImmunForsch.* 91: 175-176 (1937).
 23. *Ivanovics, G.*: Unter welchen Bedingungen werden bei der Nährbodenzüchtung der Milzbrandbazillen Kapseln gebildet? *Zbl. Bakt., I Orig.*, 138: 449-455 (1937).
 24. *Ivanovics, G.*: Die Reaktion der spezifischen Substanz und des Antikörpers der Milzbrandbazillenkapsel. *Z. ImmunForsch.* 97: 443-459 (1940).
 25. *Mann, L. S. and Spinka, I. M.*: The production of typhoid antibodies in rabbits with the use of living typhoid organisms absorbed on aluminium cream. *J. Immunol.* 53: 209-213 (1946).
 26. *Nungesser, W. J.*: Dissociation of *B. anthracis*. *J. infect. Dis.* 44: 73-125 (1929).
 27. *Preis, H.*: Experimentelle Studien über Virulenz, Empfänglichkeit und Immunität beim Milzbrand. *Zbl. Bakt., I Orig.* 49: 341-452 (1909).
 28. *Raffel, S.*: Immunopathology of tuberculosis. Proceedings of Symposium on tuberculosis in infancy and childhood. *Amer. Rev. Tuberc.* 74: 60-74 (1956).
 29. *Ramon, G.*: L'immunité et l'influence des «substances adjuvantes et stimulantes» injectées en mélange avec l'antigène. Introduction à une étude d'ensemble. *Rev. Immunol.* 3: 193-201 (1937).
 30. *Ramon, G.; Boivin, A. et Richou, R.*: Immunisation active contre le charbon au moyen d'un vaccin anavirulent et stimulé. *C.R. Acad. Sci.* 215: 498-500 (1942).
 31. *Rothbard, S. and Watson, R. F.*: Amyloidosis and renal lesion induced in mice by injection with Freund-type of adjuvant. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 85: 133-137 (1954).
 32. *Thorne, C. B.; Gomez, C. G. and Housewright, R. D.*: Synthesis of glutamic acid and glutamyl polypeptide by *Bacillus anthracis*. II. The effect of carbon dioxide on peptide production on solid media. *J. Bact.* 63: 363-368 (1952).
 33. *Tomcsik, J. und Szongott, H.*: Über die spezifischen Polysaccharide der Milzbrandbazillen. *Z. ImmunForsch.* 76: 214-234 (1933).
Über ein spezifisches Protein der Kapsel des Milzbrandbazillus. *Z. ImmunForsch.* 77: 86-99 (1933).
 34. *Tomcsik, J.*: in «Ergebnisse der Grundlagenforschung»; pp. 1-56 (G. Thieme, Stuttgart 1956).
 35. *Tomcsik, J. und Ivanovics, G.*: Über die Herstellung des Antikapsel-Immunkörpers des Milzbrandbazillus. *Z. ImmunForsch.* 93: 196-208 (1938).

36. Voisin, G. et Delaunay, A.: Sur les lésions testiculaires observées chez des animaux soumis à des injections de substances adjuvantes seules ou mélangées avec des extraits de tissu homologues. Ann. Inst. Pasteur 89: 307-317 (1955).
 37. Weiss, D. W. and Dubos, R. J.: Antituberculous immunity induced by methanol extracts of tubercle bacilli—its enhancement by adjuvants. J. exp. Med. 103: 73-85 (1956).
 38. White, R. G.; Coons, A. H. and Conolly, J. M.: Studies on antibody production. IV. The role of a wax fraction of Mycobacterium tuberculosis in adjuvant emulsions on the production of antibody to egg albumin. J. exp. Med. 102: 83-103 (1955).
-